Aus der Hämatologischen Abteilung im Klinikum
Steglitz der Freien Universität Berlin
Leiter: Prof. Dr. med. H. Brücher

In vitro Untersuchungen über die Lymphozyten-Stimulation und Bildung eines chemotaktischen Faktors bei Patienten mit einem Morbus Hodgkin

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Haisam Schaoua
Damaskus

1977

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549607_0085

Aus der Hämatologischen Abteilung im Klinikum
Steglitz der Freien Universität Berlin
Leiter: Prof. Dr. med. H. Brücher

In vitro Untersuchungen über die Lymphozyten-Stimulation und Bildung eines chemotaktischen Faktors bei Patienten mit einem Morbus Hodgkin

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Haisam Schaoua
Damaskus

Referent: Prof. Dr. med. H. Brücher

Korreferent: Prof. Dr. med. I. Boll

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 5. 5. 1977

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Material und Methode	12
2.1.	Patienten	12
2.2.	Kulturansatz und DNS-Synthese-messung	14
2.3.	Chemotaktischer Faktor (CTF)	16
2.4.	Füllung der Kammern	18
3.	Ergebnisse	21
3.1.	Kinetik der Lymphozyten-Transformation	21
3.2.	Kinetik der Produktion des chemotaktischen Faktors	23
3.3.	Einfluß von Inhibitoren der DNS-Synthese auf die Produktion des chemotaktischen Faktors	24
3.4.	Lymphozyten-Transformation	28
3.5.	Synthese des CTF bei Patienten mit Morbus Hodgkin und Normalpersonen	30
4.	Diskussion	33
5.	Zusammenfassung	43
6.	Literaturverzeichnis	45

1. Einleitung

Der Athener Historiker Thukydides (455 - 395 v. Chr.) berichtet, daß ohne die Hilfe jener Personen, die die Pest überstanden hatten, die Versorgung der Pestkranken nicht möglich gewesen wäre; schon damals war bekannt, daß diese Personen nicht noch einmal an der Pest erkrankten.
Im elften Jahrhundert fanden Chinesische Ärzte heraus, daß die Inhalation von pulverisierten Pockenkrusten das spätere Auftreten dieser Erkrankung verhindern kann (43).

Jenner machte schließlich 1796 die Entdeckung, daß eine Inokulation mit Krusten nicht virulenter Kuhpocken Menschen vor einer Pockeninfektion schützen kann (45).

1881 beobachtete Pasteur, daß überalterte Kulturen von Hühnerpesterregern bei Übertragung auf Versuchstiere ihre krankmachende Wirkung eingebüßt hatten, jedoch eine Resistenz gegen nachfolgende Infektionen mit diesem Erreger hinterließen (66).

Damit waren die Möglichkeiten für eine experimentelle Erforschung und eine therapeutische Ausnutzung der Abwehrreaktionen des Körpers gegeben. Pasteur selbst war der

erste, der eine Theorie des Immunsystems aufstellte.

In den folgenden Jahrzehnten wurden in rascher Folge die wesentlichen Grundlagen der humoralen Immunantwort aufgedeckt, d.h. der Abwehrform des Körpers, die mit der Produktion freier Antikörper gegen von außen eindringende Substanzen einhergeht. Daneben wurden auch andere Reaktionsformen beschrieben, wie etwa die Tuberkulinreaktion. Jedoch blieben die Voraussetzungen für das Zustandekommen dieser Form der Abwehr längere Zeit unklar.

1942 gelang es Landsteiner und Chase eine Kontaktallergie gegen Picrylchlorid, welche ein ähnliches Reaktionsmuster zeigt wie eine Tuberkulinreaktion, mit Leukozyten aus dem Peritonealexsudat sensibilisierter Meerschweinchen auf nicht sensibilisierte Meerschweinchen zu übertragen. Eine Übertragung durch Serum sensibilisierter Tiere war dagegen erfolglos (54). 1945 konnte Chase gleiche Ergebnisse bei der Übertragung der Tuberkulinempfindlichkeit auf Meerschweinchen mit negativem Hauttest erzielen (21). Später wurde festgestellt, daß nicht nur Leukozyten aus dem Peritonealexsudat, sondern auch solche aus dem peripheren Blut und aus Lymphknoten eine Immunreaktion vom verzögerten Typ übertragen können.

Die zentrale Rolle der kleinen Lymphozyten bei dieser Form der Immunantwort ebenso wie bei der humoralen Immunantwort wurde wesentlich durch die Arbeiten von Gowans aufgeklärt (33). Er kannalikulierte bei Ratten den Ductus thoracicus, markierte die auf diese Art isolierten Lymphozyten radioaktiv und verfolgte deren Schicksal im Körper nach Reinfusion. Dabei stellte er fest, daß ein Pool von Lymphozyten existiert, der ständig vom Blut in die lymphatischen Gewebe und von dort über die großen Lymphgefäße zurück ins Blut rezirkuliert. Entfernte man diesen Pool rezirkulierender Lymphozyten durch chronische Drainage des Ductus thoracicus, dann zeigten die so behandelten Tiere eine deutlich verringerte Antikörperproduktion gegen solche Antigene wie Tetanustoxoid oder Schafserythrozyten sowie eine verminderte Fähigkeit zur Abstoßung von Transplantaten. Diese Verminderung der Immunantwort war reversibel durch Übertragung von Ductus thoracicus - Lymphozyten einer anderen Ratte. Die Wiederherstellung der Immunantwort gelang auch dann, wenn die Lymphozyten aus dem Ductus thoracicus des anderen Tieres vor der Übertragung 24 Stunden lang bei 37 ^{o} C inkubiert wurden, wodurch die großen und

mittleren Lymphozyten zugrunde gehen und lediglich die kleinen Lymphozyten überleben (34).

Die Beobachtung, daß Patienten mit angeborenen (primären) Immundefekterkrankungen Thymusabnormalitäten aufweisen können, führt zu der Vermutung, daß der Thymus eine wesentliche Rolle für die Ausbildung der Immunantwort spielt (11, 79).

Durch Tierexperimente konnte gezeigt werden (57), daß die Entfernung des Thymus bei neugeborenen Mäusen zu einer Abnahme der Zahl der rezirkulierenden Lymphozyten, zu einer Abschwächung der Transplantatabstoßung und zu einer verminderten Produktion von Antikörpern gegen bestimmte Antigene führt. Ebenso führt eine Röntgenbestrahlung erwachsener Mäuse bei entsprechender Dosierung zu einer kompletten Unterdrückung der Immunantwort. Diese Antwort kann durch Injektion von Knochenmarkzellen eines unbestrahlten Tieres wieder hergestellt werden. Dies gelingt jedoch nicht, wenn die Empfängertiere vor der Bestrahlung thymektomiert werden; auf der anderen Seite können in einem solchen Fall Milz- oder

Lymphknotenzellen die Immunantwort wieder herstellen. Diese Befunde führten zu der Vorstellung, daß der Thymus in der Lage ist, Stammzellen aus dem Knochenmark immunologisch kompetent zu machen (19, 26, 59). Nach der heute allgemein akzeptierten Anschauung wandern undifferenzierte Stammzellen während der Fetalperiode aus dem Dottersack, der fetalen Leber und später aus dem Knochenmark in den Thymus und reifen hier zu immunkompetenten Lymphozyten aus. Während dieser Entwicklung erlangen sie die Fähigkeit, zwischen körpereigenen und körperfremden Strukturen zu unterscheiden (18). Da diese Zellen zu ihrer Ausreifung einen intakten Thymus benötigen, werden sie als T-Lymphozyten (thymusdependend) bezeichnet. Diese Zellen sind bei Mäusen durch bestimmte Differenzierungsantigene der Zellmembran gekennzeichnet wie z.B. durch das Thymus-Leukämie-Antigen TL, das Theta-Alloantigen und andere (16, 75, 91).

Bei Kücken gelang der Nachweis eines weiteren lymphatischen Organs, der Bursa Fabricii, dem eine zentrale Bedeutung für die Ausreifung derjenigen Lymphozyten zukommt, die für die humorale Immunantwort verantwort-

lich sind (24, 31). Bei Säugern ist ein Äquivalent für die Bursa der Vögel nicht gefunden worden. Dennoch bezeichnet man die Lymphozyten, von deren Funktionstüchtigkeit die Produktion von freien Antikörpern abhängig ist, als B-Lymphozyten (bursa-equivalent-dependend). Reife B-Lymphozyten lassen sich durch den Nachweis von Immunglobulinen an ihrer Oberfläche mit Hilfe von fluorescein-konjugierten Antiseren erkennen (32, 50, 68, 71, 74). Die ersten Immunglobulin produzierenden Lymphozyten lassen sich bei Säugern in der fetalen Leber zu einem Zeitpunkt nachweisen, zu dem noch keine Knochenmarkanlage zu erkennen ist und die Leber als das wesentliche Stammzellreservoir anzusehen ist (54). Während die B-Lymphozyten heute als Vorläufer der antikörperbildenden Zellen angesehen werden (79), spricht man den T-Lymphozyten eine Rolle zu bei der Abwehr fakultativ und obligat intrazellulärer Erreger, bei der Allergie vom verzögerten Typ (26, 34, 59), bei der Transplantatabstoßung, bei der Begrenzung des Tumorwachstums und bei den Autoimmunerkrankungen (19, 52). Außerdem sprechen viele Untersuchungen dafür, daß den

T-Lymphozyten in Zusammenarbeit mit B-Zellen eine wichtige Funktion bei der Antikörperproduktion gegen die meisten Antigene zukommt (sogenannte Helferzell-Funktion der T-Lymphozyten) (22, 26, 47, 58).

Die Anschauung von der direkten T-Zellwirkung ist teilweise modifiziert worden durch die Feststellung, daß einige Immunphänomene durch sogenannte Mediatoren bewirkt werden, die als Resultat einer Interaktion zwischen Antigen und T-Lymphozyten von diesen Zellen synthetisiert und sezerniert werden.

Dieses Konzept basierte ursprünglich auf dem experimentellen Gelingen eines Transfers der Tuberkulinempfindlichkeit beim Menschen durch einen zellfreien Extrakt aus peripheren Blutlymphozyten (2) und dem Befund, daß Produkte einer Antigen-Lymphozyteninteraktion beim Meerschweinchen in der Lage sind, die Wanderung von Meerschweinchenmakrophagen zu hemmen (15, 25). Seitdem sind zahlreiche solcher Produkte einer Aktivierung lymphoider Zellen beschrieben worden, bei denen es sich nicht um Immunglobuline handelt, sondern um niedermolekulare Substanzen, die in vitro cytotoxische, wachs-

tumshemmende, mitogene oder chemotaktische Wirkung besitzen. Die chemische Natur dieser sogenannten Lymphokine ist zum großen Teil noch unbekannt und ihre biologische Bedeutung weitgehend unklar (12, 13, 28, 38, 48, 67, 72).

Einen großen Fortschritt für die immunologische Forschung brachte die Entdeckung Nowells, daß Lymphozyten in vitro durch Phythämagglutinin (PHA), ein aus der roten Nierenbohne gewonnenes Lektin, zur Proliferation gebracht werden können (62). Die Lymphozyten teilen sich mitotisch weiter, es entstehen blastenähnliche Zellen, deren Charakteristika ein besonders stark basophiles und an Vakuolen reiches Plasma sowie ein oder mehrere Nucleoli sind (86, 87, 92). Heute ist eine ganze Reihe anderer Substanzen bekannt (Abb. 1, S. 11), die eine ähnlich stimulierende Wirkung in vitro auf Lymphozyten haben; die meisten dieser sogenannten Mitogene sind in der Lage, ausschließlich T-Lymphozyten zu Blasten zu transformieren (9, 28, 60, 67, 72).

Es hat sich herausgestellt, daß auch in den zellfreien Kulturüberständen solcher mitogenstimulierter Lympho-

zyten Mediatoren zu finden sind, die in vitro die gleichen Wirkungen zeigen wie diejenigen, die als Produkte einer spezifischen Wechselwirkung zwischen sensibilisierten Lymphozyten und Antigenen in vivo auftreten (70). Altman und Mitarbeiter haben kürzlich über einen chemotaktischen Faktor berichtet, der von menschlichen Lymphozyten in vitro unter dem Einfluß von PHA oder bei tuberkulinpositiven Spendern von Purifid protein derivate of tuberculin (PPD) gebildet wird (8). Dieser Faktor wirkt chemotaktisch auf menschliche Monozyten. Damit ist die Möglichkeit gegeben, in einem rein menschlichen System die Synthese einer Substanz quantitativ zu untersuchen, die als ein Mediator der zellulären Immunität anzusehen ist und vermutlich auch in vivo Bedeutung hat.

Hämatologische Systemerkrankungen wie etwa Morbus Hodgkin (Lymphogranulomatose) sind unter anderem dadurch gekennzeichnet, daß sie einen Immundefekt aufweisen. Dieser Immundefekt äußert sich klinisch in einer verstärkten Infektanfälligkeit; außerdem ist bekannt, daß bei diesen Patienten häufig ein negativer Ausfall von Kutanreaktionen (z.B. auf Tuberkulin) zu finden ist, und

daß die Abstoßung homologer Hauttransplantate verzögert ist (1, 3, 49, 79). Diese in vivo feststellbaren Veränderungen der zellulären Immunantwort werden ergänzt durch Befunde, die mit Hilfe von in vitro-Methoden erhoben wurden. So ist z.B. die Lymphozytenstimulierung mit PHA und anderen Mitogenen bei diesen Erkrankungen in der Regel stark beeinträchtigt (39, 40, 41, 80, 82).

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob bei Patienten mit Morbus Hodgkin eine Korrelation zwischen dem Ausmaß der durch PHA induzierten DNS-Synthese und der ebenfalls durch PHA induzierten Produktion eines chemotaktischen Faktors besteht.

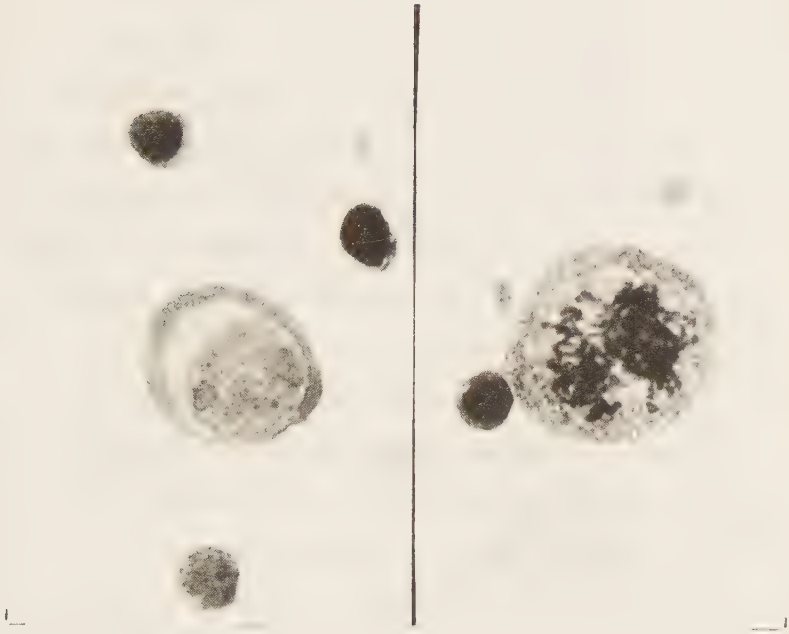

Abb. 1

Links im Bild eine blastenähnliche Zelle mit zwei Nucleoli sowie zahlreichen Vakuolen, daneben drei normale Lymphozyten.

Rechts, blastenähnliche Zelle in der Mitose und ein normaler Lymphozyt.

2. Material und Methode

2.1. Patienten:

Es wurden 20 Patienten mit histologisch gesicherter Morbus Hodgkin untersucht. Das Alter der Patienten lag zwischen 14 - 72 Jahren. In der Regel wurden die in vitro Untersuchungen zum Zeitpunkt der Diagnosestellung und vor Einleitung einer spezifischen Therapie durchgeführt. In jedem Fall betrug der zeitliche Abstand zwischen einer zuletzt durchgeführten Behandlung (Bestrahlung oder Chemotherapie) mindestens vier Wochen.

Eine Einteilung in die klinischen Stadien nach dem heute allgemein anerkannten Schema (78) erfolgte aufgrund der klinischen Untersuchung und radiologischer Untersuchungen einschließlich caudaler Lymphoangiographie.

In der Tabelle 1 (S. 13) sind die wichtigsten klinischen Daten der von uns untersuchten Patienten aufgeführt. Die Mehrzahl der Patienten war unbehandelt und befand sich in einem fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung; nur 4 Patienten befanden sich in Remission.

Als Kontrolle dienten 20 gesunde Versuchspersonen im Alter zwischen 20 - 45 Jahren.

Tabelle I

Einteilung der Patienten mit Lymphogranulomatose im Hinblick auf das Erkrankungsstadium

Patienten	Alter	Stadium vor der Therapie	Vorangegangene Therapie	Stadium z.Z. der Untersuchung	PHA-Stimulation	Chemotaktische Aktivität *
S.R.	19	II A	Ra	R	61.318	320
H.S.	30	II A	Ra	R	26.529	287
I.K.	42	II A	Ra	R	20.972	268
A.G.	42	II A	Ra	R	44.829	275
A.S.	14	II B	keine	II B	56.397	429
D.B.	27	II B	keine	II B	64.325	092
R.Z.	32	II B	Ra	III B	38.107	303
H.G.	48	II B	keine	II B	22.679	227
H.B.	22	III A	keine	III A	50.376	228
D.B.	68	III A	keine	III A	9.017	241
H.K.	72	III A	Z	III A	57.219	283
S.F.	56	III B	Z	IV B	17.356	301
H.G.	28	III B	keine	III B	9.725	078
A.B.	24	IV B	keine	IV B	2.987	099
H.K.	29	IV B	keine	IV B	25.308	253
H.R.	36	IV B	keine	IV B	17.097	051
R.T.	38	IV B	keine	IV B	2.987	099
U.S.	47	IV B	keine	IV B	2.513	073
P.S.	61	IV B	keine	IV B	8.510	120
I.S.	62	IV B	keine	IV B	4.819	151

R = Remission

Ra = Zustand nach Radiatio

Z = Zustand nach zytostatischer Therapie

* Angegeben ist die Zahl der durchgewanderten Monozyten / 25 Gesichtsfelder

2.2. Kulturansatz und DNS-Synthesemessung

Heparinisiertes Venenblut (10 IE/ml Liquemin^{R}, Roche) wurde im Verhältnis 1 : 10 mit 6 %igem Dextran (Macrodex^{R}, Knoll AG, Deutschland) vermischt. Nach einer Stunde Sedimentation bei 37^{o}C wurde der leukozytenreiche Überstand abpipettiert. Anschließend wurde die Leukozytensuspension nochmals bei 1000 U/Min. für 10 Minuten zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden zweimal mit RPMI 1640 Medium (Biocult) gewaschen. Die exakte Einstellung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe eines Partikelzählers (Coulter Counter Modell S).

Zur Kultivierung wurden Einwegplastikröhrchen (16 x 125 mm, Falcon) verwendet; als Medium diente RPMI 1640 (Biocult). Der normale Kulturansatz von 3 ml enthielt 1 x 10^{6} Leukozyten/ml sowie 10 % autologes Serum, 2 mMol/ml L-Glutamin, 100 IE/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Medium, Antibiotika und L-Glutamin wurden von Gibco-Biocult Laboratories Ltd., Glasgow-Scotland, bezogen.

Alle Kulturen wurden in einem begasten Brutschrank (5 % CO_2 in Luft) bei 37^{o}C inkubiert. Zur Messung der Lympho-

zyten-Transformation wurden die Kulturen mit und ohne PHA (Phytohämagglutinin-P, Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA) 72 Std. lang inkubiert. Von den Patienten Leukozyten wurden zusätzlich Kulturen 144 Std. inkubiert.

Als Parameter der Stimulation diente die Messung des Gesamteinbaues von ^{3}H-Thymidin (TdR^{3}H) in die säureunlösliche Fraktion der DNS. Dazu erhielten Dreifachkulturen während der letzten vier Stunden der Inkubation je 2 µCi TdR^{3}H (spezifisches Aktivität 2 Ci/mM; Radiochemical Centre Amersham, England) und wurden anschließend in ein Eisbad gestellt. Sie wurden dann nacheinander in 4 ml gekühlter 0,9 %iger Kochsalzlösung (zweimal), in 2 ml gekühlter 5 %iger Trichloressigsäure (zweimal) und in 2 ml gekühltem absoluten Äthylalkohol (einmal) gewaschen (Zentrifugation 10 Min. bei 4^{o}C und 1000 U/Min.). Das Sediment wurde mit Hyamine (Packard) versetzt und 45 Min. bei 60^{o}C inkubiert. Der Inhalt jedes Kulturröhrchens wurde mit 3 x 5 ml Szintillationsflüssigkeit (100 g Naphtalin (Merck), 7 g PPO (Merck), 0,3 g POPOP (Packard) auf 950 ml Dioxan) in Probengläschen überführt. Diese wurden in einem Tricarb-Szintillationsspektrometer Modell 3380 (Packard) dreimal 5 Min. unter Verwendung eines auto-

matischen externen Standards gemessen. Die Ergebnisse werden als mittlere Impulszahl/Kultur/Min. (cpm) von Dreifachkulturen angegeben.

2.3. Chemotaktischer Faktor (CTF):

Für die Untersuchung des chemotaktischen Faktors haben wird die von Altman et al. 1973 (8) beschriebene Methode mit geringen Änderungen angewandt.

Das Prinzip dieser Methode besteht darin, daß der Einfluß zellfreier Kulturüberstände auf die Wanderung von Monozyten getestet wird. Dies geschieht mit Hilfe von Kammern - modifiziert nach Boyden - (s. Abb. 2, S. 20), die durch einen Filter (C) in zwei Kompartimente unterteilt werden, von denen der eine Abschnitt (B) die Kulturüberstände und der andere (A) die Testzellen enthält. Die Überstände wurden aus stimulierten Kulturen gewonnen, die ohne Serumzusatz angelegt und für verschieden lange Zeiten inkubiert wurden. Die Kulturdauer betrug in der Regel 24 Stunden, da zu diesem Zeitpunkt bereits das Maximum der Synthese des CTF erreicht war. Kontrollkulturen erhielten keinen Mitogenzusatz.

An Lymphozytenkulturen von Normalpersonen wurde der Einfluß von L-Asparaginase aus Escherichia Coli (Behring AG, Deutschland) und Hydrocortison (Schering AG, Berlin) auf die durch PHA induzierte Lymphozyten-Stimulation und Synthese des chemotaktischen Faktors untersucht. Den Kulturen wurden dazu zu Beginn der Inkubationszeit zusammen mit PHA entweder verschiedene Konzentration L-Asparaginase oder Hydrocortison zugesetzt. Um auszuschließen, daß L-Asparaginase bzw. Hydrocortison selbst einen Einfluß auf die Wanderung der Monozyten haben, wurden den Überständen unmittelbar vor Füllung der Kammern die beiden Präparate in verschiedenen Konzentrationen zugesetzt. Zur Gewinnung zellfreier Überstände wurden die Kulturen 2 x 10 Min. bei 3000 U/Min. zentrifugiert.

Die zellfreien Überstände wurden im Verhältnis 30 : 70 vol% mit Hank's-Lösung (Biocult) gemischt und so zur Füllung des unteren Teils der Kammern (Teil B, s. Abb. 2, S. 20) verwendet.

Die Testzellen für die Überprüfung der chemotaktischen Aktivität wurden nach der Methode von Boyum 1968 (17) gewonnen. Zunächst wurden 10 ml einer Ficoll-Isopaque-

Lösung in ein großes Zentrifugenglas pipettiert. Die Ficoll-Isopaque-Lösung bestand aus 9,566 g Ficoll 400 (Pharmacia Fine Chemical, Schweden), 20 ml Ronpacon 75 % Isopaque^{R} (Cilag-Chemie, Deutschland) und 130,4 ml Aqua dest. Heparinisiertes Venenblut gesunder Versuchspersonen wurde im Verhältnis 1 : 4 mit 0,9 %iger Kochsalzlösung verdünnt. Jeweils 20 ml des verdünnten Blutes wurden vorsichtig über die 10 ml Ficoll-Isopaque-Lösung geschichtet. Die Gläser wurden dann für 40 Min. bei 400 x g zentrifugiert und die leukozytenreiche Grenzschicht zwischen dem verdünnten Plasma und der Ficoll-Isopaque-Lösung mit Pasteurpipetten entfernt. Die so gewonnenen Zellen wurden zweimal mit Hank's-Lösung jeweils 10 Min. lang bei 1000 U/Min. gewaschen. In Ausstrichpräparaten dieser Zellsuspension betrug der Anteil der Monozyten 15 $\pm$ 5 %, der Anteil an Granulozyten unter 5 %, der Rest waren Lymphozyten. Zur Verwendung in den Kammern wurde die Zellzahl auf 2×10^{6}/ml eingestellt.

2.4. Füllung der Kammern:

Die Kammern wurden von der Fa. Neuroprobe Inc., Bethesda, Md., USA, bezogen (s. Abb. 2, S. 20). Die beiden Ab-

schnitte der Kammern wurden durch ein Membranfilter (C) (Nuclepore, Wallabs Inc., San Raffael, California, USA) getrennt, deren Porendurchmesser 5 µ betrug. In den unteren Teil (B) der Kammern wurden die mit Hank's-Lösung verdünnten Kulturüberstände gefüllt, und zwar 1,5 ml pro Kammer. In den oberen Teil der Kammern (A) wurden 0,7 ml der Testzellsuspension pipettiert. Die gefüllten Kammern wurden 90 Min. bei 37°C inkubiert, und die Filter herausgenommen und nach Pappenheim gefärbt.

Für die quantitative Auswertung der chemotaktischen Aktivität in den Kulturüberständen wurden bei 1000-facher Vergrößerung die vollständig durchgewanderten Monozyten in 25 Gesichtsfeldern gezählt und das arithmetische Mittel der Auszählung von drei Filtern bestimmt.

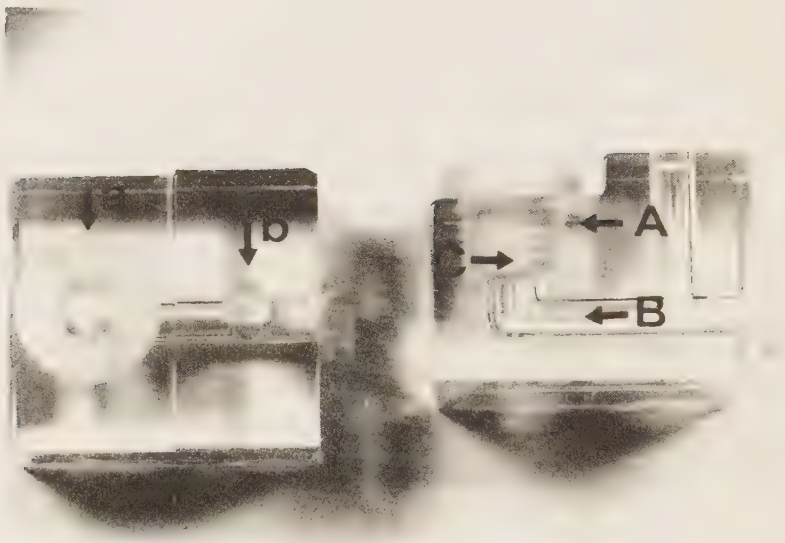

Abb. 2

Eine der Kammern (Neuroprobe Inc., Bethesda, Md., USA) die für diese Arbeit von uns benutzt wurde.
Die beiden Abschnitte A und B wurden durch Membranfilter getrennt (C). a und b Eingang zur Kammer A bzw. Kammer B. In den oberen Teil der Kammer A wurde 0,7 ml Testzellsuspension pipettiert. In den unteren Teil (B) wurden die mit Hank's-Lösung verdünnten Kulturüberstände gefüllt, und zwar 1,5 ml pro Kammer.

3. Ergebnisse

3.1. Kinetik der Lymphozyten-Transformation

Leukozyten von gesunden Versuchspersonen und von Patienten mit Morbus Hodgkin wurden mit 1,0 /ug/ml PHA inkubiert; Kontrollkulturen erhielten keinen Mitogenzusatz. Nach unterschiedlich langer Inkubationszeit wurden die Kulturen für die letzten vier Stunden mit ^{3}H-Thymidin (^{3}H-TdR) versetzt und der Einbau in die DNS gemessen. Die Ergebnisse typischer Experimente zeigen, daß das Maximum der DNS-Synthese bei Normalpersonen nach einer Inkubationszeit von 72 Stunden erreicht war. Bei Patienten mit Morbus Hodgkin dagegen fand sich nach 72 Stunden nur ein geringer ^{3}H-Thymidineinbau; das Maximum der Stimulation war hier in der Regel erst nach 120 oder 144 Stunden erreicht. Diese Ergebnisse sind in der Abb. 3a (Seite 22) dargestellt. Diese Abbildung zeigt außerdem, daß die Patienten-Lymphozyten in der Regel weit schlechter stimulierbar waren als die Lymphozyten von gesunden Versuchspersonen. Auch nach 144-stündiger Inkubationszeit wurden selten Werte gefunden, die im Normalbereich lagen.

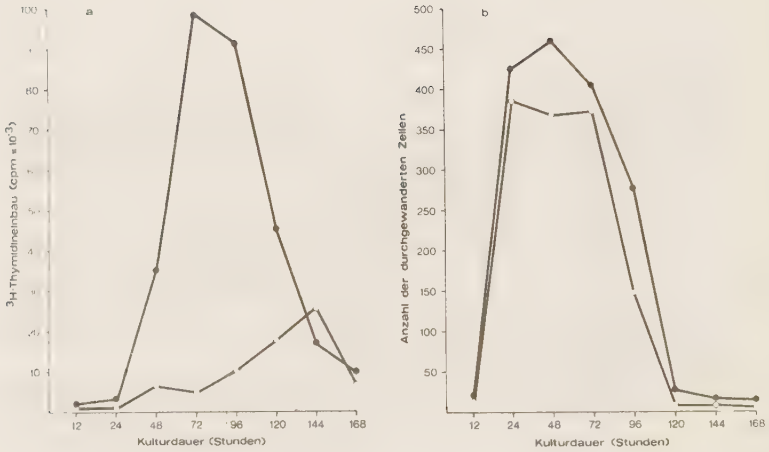

Abb. 3

(a) ^{3}H-Thymidineinbau und (b) Produktion eines chemotaktischen Faktors in Lymphozytenkulturen von Normalpersonen (●) und in Kulturen von Patienten mit Morbus Hodgkin (○).

3.2. Kinetik der Produktion des chemotaktischen Faktors:

Hierzu wurden Lymphozyten von normalen Personen und Patienten in serumfreiem Medium für verschieden lange Zeiten kultiviert; PHA wurde in verschiedene Konzentrationen (0,1 - 5,0 µg/ml) zu Beginn zugesetzt. Vorversuche hatten gezeigt, daß die optimale PHA-Konzentration zwischen 0,3 - 1,0 µg/ml betrug. Wie aus der Abbildung 3b (Seite 22) hervorgeht, fand sich die maximale Aktivität in den Überständen bei Normalpersonen und Patienten nach 24 Stunden. Durch eine längere Kulturdauer (48 - 96 Std.) konnte keine weitere Steigerung der Aktivität erreicht werden. Bei einer Kulturdauer über 96 Std. wurde ein deutlicher Abfall der chemotaktischen Aktivität beobachtet, was vermutlich darauf zurückzuführen ist, daß in den serumfreien Kulturen die Kulturbedingungen bei einer Kulturdauer von mehr als 48 Std. schlechter werden. Die chemotaktische Aktivität in den Kontrollkulturen (Kulturen ohne PHA-Zusatz) war über die gesamte gestestete Kulturdauer gleichbleibend niedrig. Wie aus der Abb. 3b (Seite 22) hervorgeht, fanden sich in bezug auf die Kinetik der Produktion des chemotaktischen Faktors keine Unterschiede zwischen den gesun-

den Versuchspersonen und den Patienten. In beiden Kollektiven war das Maximum jeweils nach 24 Std. erreicht. Um sicher zu gehen, daß PHA selbst nicht chemotaktische Eigenschaften besitzt, wurden in einigen Experimenten verschiedene PHA-Konzentrationen zu den Überständen (0,1 - 5,0 µg/ml) unmittelbar vor der Füllung der Kammern zugegeben. Es hat sich dabei gezeigt, daß die chemotaktische Aktivität in diesen Kontrollüberständen durch die verwendeten PHA-Konzentrationen nicht beeinflußt wurde.

3.3. Einfluß von Inhibitoren der DNS-Synthese auf die Produktion des chemotaktischen Faktors:

Die Untersuchung zur Kinetik der chemotaktischen Faktorsynthese hatten gezeigt, daß der chemotaktische Faktor bereits zu einem Zeitpunkt nachweisbar war, zu dem noch keine DNS-Synthese meßbar war. In einer Reihe von Experimenten sollte nun die Frage untersucht werden, ob auch bei vollständiger Blockierung der DNS-Synthese durch Substanzen, die bekanntermaßen die Lymphozytenstimulation hemmen, eine Produktion des chemotaktischen Faktors nachweisbar war.

Die Tabelle II (S. 25) zeigt anhand eines typischen Beispiels, daß Hydrocortison, wenn es in verschiedenen Kon-

zentrationen den Zellkulturen von Normalpersonen zusammen mit PHA zugesetzt wurde, zu einer dosisabhängigen Hemmung der DNS-Synthese und Produktion des chemotaktischen Faktors führt.

Tabelle II: Einfluß von Hydrocortison auf Lymphozyten-Stimulation und Synthese eines chemotaktischen Faktors

Hydrocortison /ug/ml	Stimulations-index	chemotaktische Aktivität *
0	178.5	260.5
1.0	170.0	164.0
10.0	120.5	148.0
50.0	52.0	65.3
100.0	5.0	40.5
200.0	3.2	38.2

* : Zahl der durchgewanderten Monozyten/25 Gesichtsfelder. Durchschnittswert aus Dreifachansätzen.

Wurden den Zellkulturen verschiedene Konzentrationen von L-Asparaginase zu Versuchsbeginn zugesetzt, so kam es auch hier zu einer vollständigen Hemmung der durch PHA

induzierten DNS-Synthese wie das typische Beispiel in der Tabelle III zeigt. Selbst hohe Konzentrationen des Enzyms hatten keinen meßbaren Einfluß auf die Produktion des chemotaktischen Faktors.

Wurden Hydrocortison bzw. L-Asparaginase den Überständen unmittelbar vor Füllung der Kammern zugesetzt, so zeigt sich, daß dadurch die Ergebnisse nicht beeinträchtigt wurden (s. Tabelle IV, S. 27).

Tabelle III: Einfluß von L-Asparaginase auf die PHA induzierte Lymphozyten-Stimulation und Synthese eines chemotaktischen Faktors

L-Asparaginase IE/ml	Stimulations-index	chemotaktische Aktivität *
0.0	172.3	160.5
0.1	116.7	164.2
0.5	74.3	162.5
1.0	21.4	170.0
2.0	7.5	150.0
3.0	3.2	135.6
5.0	3.4	120.0

* : Zahl der durchgewanderten Monozyten/25 Gesichtsfelder. Durchschnittswerte aus Dreifachansätzen.

Tabelle IV: Einfluß von L-Asparaginase und Hydrocortison auf die chemotaktische Aktivität. Überständen aus stimulierten und unstimulierten Zellkulturen wurden unmittelbar vor der Bestimmung verschiedene Konzentrationen L-Asparaginase bzw. Hydrocortison zugesetzt.

Überstand		chemotaktische Aktivität *	
		Exp. I	Exp. II
Kontrollkulturen		12 ± 4	28 ± 7
L-Asparaginase	0.1 IE/ml	11 ± 3	33 ± 6
L-Asparaginase	1.0 IE/ml	22 ± 4	21 ± 2
L-Asparaginase	10.0 IE/ml	15 ± 2	41 ± 6
PHA-Kulturen		396 ± 32	273 ± 19
Hydrocortison	10.0 µg/ml	428 ± 13	321 ± 18
Hydrocortison	50.0 µg/ml	346 ± 28	297 ± 5
Hydrocortison	100.0 µg/ml	272 ± 33	257 ± 11
Hydrocortison	200.0 µg/ml	313 ± 16	203 ± 14

* : Zahl der durchgewanderten Monozyten/25 Gesichtsfelder.

Durchschnittswert aus Dreifachkulturansätzen.

3.4. Lymphozyten-Transformation:

Die Ergebnisse der von uns untersuchten Normalversuchspersonen und Patienten sind in der Abbildung 4 (S. 29) dargestellt. Der ^{3}H-TdR-Einbau wurde bei den Normalpersonen nach 72 Std. gemessen, bei den Patienten zusätzlich nach 144 Std. Es zeigte sich, daß die Stimulationsfähigkeit der Patienten-Lymphozyten, verglichen mit dem normalen Kollektiv, deutlich eingeschränkt war. Der ^{3}H-TdR-Einbau als Maß für die Stimulierbarkeit betrug bei den Patienten im Durchschnitt 26.000 CPM nach 72 Std., verglichen mit 133.000 CPM bei den normalen Personen. Dieser Unterschied war statistisch signifikant ($P < 0,01$ Wilcoxon-Test). Durch Verlängerung der Inkubationszeit bis 144 Std. konnte die Stimulationsrate bei den Patienten gesteigert werden (im Durchschnitt 51.000 CPM), ohne allerdings ein normales Ausmaß zu erreichen. Nur bei drei Patienten war das Maximum der DNS-Synthese bereits nach 72 Std. erreicht; diese Patienten befanden sich in einer Vollremission. Die DNS-Synthese in Kontrollkulturen, die ohne PHA-Zusatz angelegt wurden, war gleichbleibend gering (600 - 1.000 DPM). Bei den Patienten mit Morbus Hodgkin war der ^{3}H-TdR-Einbau in den Kulturen ohne PHA-Zusatz nach 144 Stunden etwas höher als nach 72 Stunden.

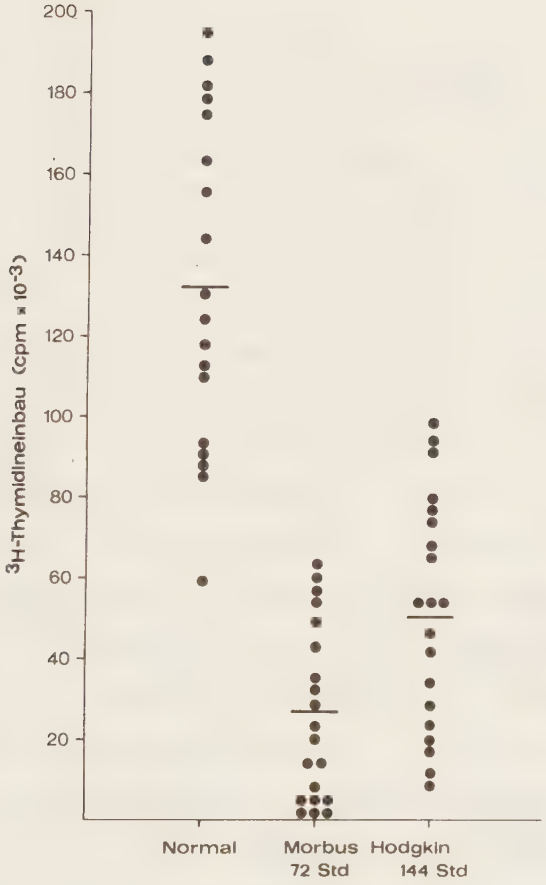

Abb. 4

Lymphozyten-Transformation bei Normalpersonen und Patienten mit Morbus Hodgkin. Jeder Punkt stellt den Mittelwert von jeweils drei Kulturansätzen dar, während der waagerechte Strich den Durchschnittswert des jeweiligen Gesamtkollektivs wiedergibt.

3.5. Synthese des CTF bei Patienten mit Morbus Hodgkin und Normalpersonen:

Leukozyten von Patienten mit Morbus Hodgkin und Normalpersonen wurden zusammen mit PHA (0,3 µg/ml) für 24 Std. inkubiert; Kontrollüberstände erhielten kein Mitogen.
Im Gegensatz zu der erheblich verminderten PHA-induzierten DNS-Synthese war die Synthese des CTF bei den von uns untersuchten 20 Patienten nicht wesentlich beeinträchtigt (s. Abb. 5, S. 31); die Unterschiede zwischen den Ergebnissen im Normal- und Patientenkollektiv waren statistisch nicht signifikant ($P > 0,1$ Wilcoxon-Test). In den Kontrollüberständen war bei beiden Gruppen keine chemotaktische Aktivität nachweisbar, die Zahl der durchgewanderten Zellen lag zwischen 3 und 12 Zellen/25 Gesichtsfeldern.

Es zeigte sich weiter, daß bei den Patienten keine Korrelation zwischen Ausmaß der DNS-Synthese und Produktion des CTF bestand (s. Tab. I, S. 13).

Aus den Abb. 6a und 6b (S. 32) geht außerdem hervor, daß zwischen den absoluten Lymphozytenzahlen im peripheren Blut und dem Ausmaß der PHA-Stimulation bzw. der chemotaktischen Aktivität keine Korrelation bestand.

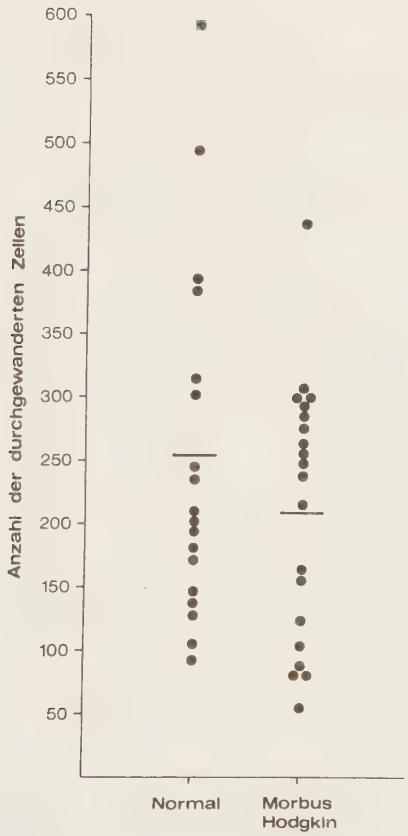

Abb. 5

Produktion eines chemotaktischen Faktors durch Leukozyten von Normalpersonen und von Patienten mit Morbus Hodgkin. Die waagerechten Striche geben den Durchschnittswert des jeweiligen Gesamtkollektivs wieder.

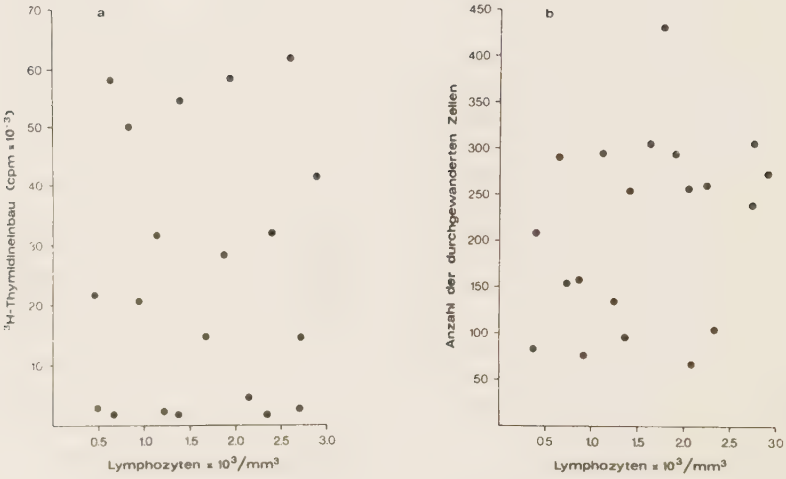

Abb. 6

Verhältnis zwischen (a) ^{3}H-Thymidineinbau, (b) chemotaktischer Aktivität und der absoluten Lymphozytenzahl im peripheren Blut bei Patienten mit Morbus Hodgkin.

4. Diskussion

Die Stimulation peripherer menschlicher Lymphozyten durch mitogene Substanzen stellt ein in vitro Modell zur Testung der Funktionstüchtigkeit dieser Zellen dar. Die Phytomitogene wie PHA und Concanavalin A sind im Gegensatz zu den Antigenen in der Lage, "unspezifisch", d.h. ohne vorausgehende Sensibilisierung DNS-Synthese und mitotische Teilung in menschlichen Lymphozyten und in Lymphozyten vieler Tierspezies zu induzieren. Da diese Substanzen fast alle selektiv auf T-Lymphozyten wirken, gibt der Lymphozyten-Stimulationstest Auskunft über die Immunkompetenz dieser Zellen.

Durch Prüfung der Lymphozytenfunktionen in vitro konnten in den letzten 10 - 15 Jahren wichtige Beiträge zum besseren Verständnis des bei vielen Erkrankungen bestehenden Immundefektes geliefert werden. Die so feststellbaren Defekte der Lymphozytenfunktionen korrelieren in der Regel gut mit Ergebnissen, die durch Untersuchungen in vivo gewonnen werden. Dies gilt in besonderer Weise für den Morbus Hodgkin. Hier liegt vorwiegend ein Defekt der zellulären Immunantwort vor; hervorstechendstes und dem Kliniker am besten bekanntes Zeichen dafür ist die gesteigerte Infektanfälligkeit der Patienten. Die Art der Infektionen weist auch bereits

auf einen Defekt der zellulären Immunität hin; so erkranken die Patienten häufig an Infektionen mit fakultativ intrazellulären Erregern wie Mycobakterien, gesteigert ist die Anfälligkeit gegenüber Pilz- und Virusinfektionen. Charakteristisch ist ferner eine Anergie oder Hypergie bei Hauttestung mit natürlichen Antigenen wie Tuberkulin, Mumps-Antigen oder Candida-Extrakten (3, 20, 53, 84). So kann selbst bei Patienten, die eine manifeste Tuberkulose haben, die Tuberkulin-Reaktion negativ sein. Diese Anergie findet sich vor allem bei Patienten in aktiven und weit fortgeschrittenen Erkrankungsstadien (klinische Stadien III und IV), ist bei empfindlicher Methodik allerdings auch in frühen Stadien festzustellen (27). Auch die Abstoßung homologer Hauttransplantate - eine weitere, durch T-Lymphozyten bewirkte Reaktion - ist bei Hodgkin-Patienten stark verzögert und es sind Fälle beschrieben worden, wo solche Transplantate überhaupt toleriert wurden (43, 49).

Im Gegensatz zu den hier dargestellten Beeinträchtigungen der zellulären Immunität ist die humorale Immunantwort in der Regel normal; nur bei Patienten in weit fortgeschrittenen Stadien der Erkrankung können sich auch hier Veränderungen zeigen (39, 41, 44).

Als strukturelles Korrelat für diese in vivo feststellbaren Defekte der zellulären Immunantwort kann die bei vielen Patienten zu findende Lymphopenie angesehen werden. Es bleibt zu untersuchen, ob diese Lymphopenie durch eine isolierte Verminderung der T-Zellen bedingt ist, oder ob auch die B-Lymphozyten vermindert sind.

Es wurde schon darauf hingewiesen, daß gerade beim Morbus Hodgkin in der Regel eine gute Korrelation zwischen den beschriebenen in vivo Reaktionen (z.B. Ausfall der Hautteste) und den Ergebnissen von in vitro Untersuchungen besteht. Bei Patienten in klinischen Stadien I oder II sind die Hautteste häufig positiv; die durch Mitogene induzierte Lymphozyten-Stimulation ist hier auch häufig normal. Im Gegensatz dazu weisen Patienten in fortgeschrittenen Stadien, die auch eine Anergie bei der Hauttestung zeigen, eine erheblich beeinträchtigte Stimulierbarkeit der peripheren Lymphozyten auf. Die von uns hier dargestellten Ergebnisse entsprechen somit den Befunden anderer Untersucher (2, 14, 39, 42, 49, 64, 76, 88). Unsere Patienten befanden sich - von wenigen Ausnahmen abgesehen - in aktiven Stadien III und IV; die Stimulierbarkeit durch PHA war entsprechend stark reduziert. Bei den Patienten, die sich als

Folge einer Behandlung in einer Vollremission befanden, war die Lymphozyten-Stimulation deutlich besser, ein Befund, der auch schon zuvor beschrieben wurde (37, 44). Dies weist darauf hin, daß der Immundefekt beim Morbus Hodgkin - soweit das in vitro ablesbar sein kann - zumindest teilweise durch die Behandlung zu korrigieren ist. Daß die in der Remission gefundenen Werte im Lymphozyten-Stimulationstest noch oft deutlich unter den bei gesunden Personen gefundenen Werten liegen, kann darauf zurückgeführt werden, daß die Einflüsse der zuvor durchgeführten Therapie hier noch eine entscheidende Rolle spielen. Dies gilt vor allem für die übliche extensive Strahlenbehandlung, die die Immunkompetenz der Lymphozyten für lange Zeit beeinflussen kann (55).

Die Aussagekraft des Lymphozyten-Stimulationstestes im Hinblick auf die Immunkompetenz der Lymphozyten wird durch einige Befunde erheblich eingeschränkt. Ist generell die Übereinstimmung zwischen Ausmaß der Stimulation und der Klinik (Stadium der Erkrankung, Remission oder aktiver Krankheitsprozeß) recht gut, so trifft das im Einzelfall längst nicht immer zu. So gibt es Patienten, bei denen ein Stadium I vorliegt, die eine verminderte Stimulation

der Lymphozyten aufweisen. Es ist weiter bekannt, daß das Ausmaß der Lymphozyten-Stimulation bei gesunden Personen und Patienten großen individuellen Schwankungen unterliegt; das wurde auch bei unseren Untersuchungen deutlich. Diese oft beträchtliche Streubreite macht es deshalb schwierig, einen Normalbereich der Reaktion exakt zu definieren.

Fragt man nun nach den Ursachen für die verminderte Stimulierbarkeit der Lymphozyten bei Hodgkin-Patienten, so müssen mehrere Möglichkeiten diskutiert werden:

1. Es gibt Hinweise dafür, daß bei Patienten mit einem Morbus Hodgkin eine Störung der Zirkulation und Rezirkulation der Lymphozyten vorliegt, was zu einer Verminderung des Anteils stimulierbarer Lymphozyten führen kann (79). Die bei vielen Patienten zu findende Lymphopenie (1, 29) könnte Ausdruck dieser Störung sein. Untersuchungen anderer Autoren (29) haben allerdings gezeigt, daß z.B. keine Korrelation zwischen der Beteiligung abdomineller Lymphknoten-Stationen und der Ausschwemmung von Lymphozyten in den Ductus thoracicus besteht; selbst bei massivem Befall der genannten Lymphknoten konnte ein normaler Zellgehalt im Ductus thoracicus gefunden werden. Ergänzend dazu fanden wir keine Beziehung zwischen Ausmaß der Lymphozyten-

Stimulation und den peripheren Lymphozytenzahlen, ein Befund, der auch den Ergebnissen anderer Untersucher entspricht (41, 55).

2. Es bleibt nun die Frage zu untersuchen, ob bei Hodgkin-Patienten eine selektive Verminderung der T-Lymphozyten im Blut vorliegt und somit das Verhältnis zwischen B- und T-Zellen zugunsten der B-Zellen verschoben ist. Es ist heute durch eine Reihe von Untersuchungen bekannt, daß sich diese beiden Lymphozyten-Populationen auch morphologisch unterscheiden lassen und somit quantitativ zu erfassen sind. B-Lymphozyten tragen Immunglobulin-Rezeptoren an ihren Membranen, die spezifisch Anti-Human Immunglobulin Seren binden (10, 61, 73, 89, 90). Bei Verwendung fluorescin-konjugierter Seren kann diese Bindung demonstriert werden, eine Bestimmung der Zahl der B-Lymphozyten ist so möglich. Den T-Zellen andererseits fehlen die Immunglobulin-Rezeptoren, sie besitzen dagegen Rezeptoren für Hammel-Erythrozyten (23, 30, 46). Die Bindung dieser Erythrozyten führt zur Ausbildung einer Rosettenfigur und der Prozentsatz solcher Rosetten-bildender T-Zellen ist leicht zu bestimmen. Untersuchungen mit Hilfe dieser Oberflächen-Merkmale haben in den letzten

Jahren wesentlich zu einer besseren Charakterisierung der lymphoproliferativen Erkrankungen beigetragen; so konnte z.B. die B-Zellnatur der leukotischen Zellen bei der überwiegenden Mehrzahl der Patienten mit chronischer lymphatischer Leukämie demonstriert werden (5, 6, 36, 69, 91).

Beim Hodgkin könnte nun die verminderte Stimulierbarkeit der peripheren Lymphozyten durch T-Zellmitogene durch eine Verminderung der T-Lymphozyten bedingt sein. In der Tat findet man auch bei vielen Patienten einen geringeren Prozentsatz Rosetten-bildender Zellen als das bei Normalpersonen der Fall ist (4, 56). Andererseits gibt es auch Patienten, bei denen die T-Zellen nicht vermindert sind und die dennoch eine erheblich reduzierte Stimulierbarkeit aufweisen.

3. Die verminderte Stimulierbarkeit ließe sich auch durch das Vorhandensein von Hemmfaktoren im Plasma der Patienten erklären und in der Tat sind solche Faktoren auch bei einigen Patienten nachgewiesen worden (83). Bei der Mehrzahl der Patienten lassen sich solche Hemmfaktoren allerdings nicht nachweisen (40, 83, 85).

Die hier genannten Befunde allein bieten keine ausreichende Erklärung für die reduzierte Stimulierbarkeit in vitro.

Es liegt deshalb der Schluß nahe, daß die T-Lymphozyten selbst einen Defekt aufweisen, über dessen Natur allerdings noch völlige Unklarheit herrscht.

In der vorliegenden Arbeit sollte weiter die Frage untersucht werden, ob bei den Patienten die Störung der T-Zellfunktion - wie sie in der verminderten PHA-Stimulation zum Ausdruck kam - auch in anderen in vitro Testsystemen feststellbar ist. Aus diesem Grunde wurde die durch das Mitogen induzierte Synthese eines chemotaktischen Faktors bei Patienten und gesunden Personen untersucht. Es zeigte sich dabei, daß die Synthese dieses Faktors bei unseren Patienten nicht signifikant erniedrigt war, obwohl gerade bei diesen Patienten die DNS-Synthese erheblich beeinträchtigt war. Eine Korrelation zwischen Ausmaß der DNS-Synthese und Produktion des chemotaktischen Faktors war nicht festzustellen. Wir haben weiter zeigen können, daß der CTF bereits zu einem Zeitpunkt in den Kulturüberständen nachweisbar ist, zu dem noch keine DNS-Synthese stattfindet. Dies deutet darauf hin, daß Produktion des CTF und DNS-Synthese zumindest zeitlich voneinander unabhängig ablaufende Vorgänge darstellen; eine vergleichbare Dissoziation wurde bereits für andere Mediatoren der

zellulären Immunität beschrieben (63, 77). Interessant in diesem Zusammenhang sind auch die Ergebnisse von Versuchen, in denen die Zellen mit L-Asparaginase zusammen inkubiert wurden. Es zeigte sich, daß dieses Enzym zwar in der Lage ist, die DNS-Synthese vollständig zu blockieren; selbst hohe Dosen führten dagegen nicht zu einer verminderten Synthese des chemotaktischen Faktors. In Kontrollversuchen haben wir ausschließen können, daß L-Asparaginase selbst chemotaktisch wirkt. Diese Befunde sind vergleichbar mit den Ergebnissen anderer Untersucher, die gezeigt haben, daß nach Bestrahlung der Lymphozyten mit hohen Dosen, die zur vollständigen Blockierung der DNS-Synthese führten, die Mediator-Produktion nicht beeinträchtigt war (51, 81).

Es ist unklar, ob Mediator-Synthese und Blastogenese Funktionen einer Lymphozytenpopulation sind, oder ob unterschiedliche Subpopulationen dafür verantwortlich sind. Vor allem durch die Untersuchungen von Altman und Mitarbeitern ist gezeigt worden, daß der chemotaktische Faktor wie die meisten der bekannten Mediatoren von T-Lymphozyten gebildet wird (6) und daß die Anwesenheit von B-Zellen nicht erforderlich ist (5). Bei Verwendung

von PHA wäre es auch wenig wahrscheinlich, daß die Synthese eines Mediators durch diese Substanz in B-Lymphozyten induziert wird. Bei der Maus gibt es nun sichere Hinweise für das Vorhandensein mehrerer T-Zellsubpopulationen, die sich funktionell unterscheiden lassen (85) und unsere an Hodgkin-Patienten erhobenen Befunde deuten in die gleiche Richtung. Die Fähigkeit zur Synthese des CTF war bei den meisten Patienten normal und dies kann heißen, daß die dafür zuständige T-Zellpopulation durch die Erkrankung nicht vermindert oder qualitativ verändert ist. Der Immundefekt wäre dann - soweit das in vitro ablesbar ist - auf bestimmte T-Zellfunktionen beschränkt.

5. Zusammenfassung:

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die durch PHA bewirkte DNS-Synthese bei Patienten mit Morbus Hodgkin stark beeinträchtigt war. Hervorzuheben ist, daß bewußt Patienten ausgesucht wurden, die sich in einem aktiven und weit fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung befanden.

Im Gegensatz dazu war die durch PHA induzierte Produktion eines auf menschliche Monozyten wirkenden chemotaktischen Faktors bei diesen Patienten nicht signifikant erniedrigt. Diese beobachtete Dissoziation ist im augenblicklichen Zeitpunkt nicht zu erklären. Beide Vorgänge, DNS-Synthese und Produktion des chemotaktischen Faktors, werden durch PHA induziert und sind, nach dem heutigen Stand der Erkenntnisse, beide als Antwort von T-Lymphozyten auf das Mitogen aufzufassen. Die Produktion des chemotaktischen Faktors ist dabei unabhängig von einer meßbaren DNS-Synthese.

Aus unseren Ergebnissen kann gefolgert werden, daß die Patienten-Lymphozyten die Fähigkeit zur normalen DNS-Synthese in vitro verloren haben, während die Produktion

des Mediators nicht beeinträchtigt ist. Es bleibt die Frage offen, ob diese immunologischen Aktivitäten durch einen Zellklon hervorgerufen werden oder Ausdruck funktionell unterschiedlicher T-Zellpopulationen sind.

6. Literaturverzeichnis

1. AISENBERG, A.C.:
Lymphopenia in Hodgkin's disease.
Blood. 25, 1037 (1965)

2. AISENBERG, A.C.:
Quantitative estimation of reactivity of normal and Hodgkin's disease lymphcyte with thymidin -2- C^{14}.
Nature (London), 205, 1233 (1965)

3. AISENBERG, A.C.:
Studies on delayed hypersensitivity in Hodgkin's disease.
J. Clin. Inwest. 41, 1964 (1962)

4. AIUTI, F., Wigzell, H.:
Function and distribution pattern of human T lymphocytes. II. Presence of T lymphocytes in normal humans and in humans with various immunodeficiency disorders.
Clin. exp. Immunol. 13, 183 (1973)

5. AISENBERG, A.C., Bloch, K.J.:
Immunglobulin on the surface of neoplastic lymphocytes.
New Engl. J. Med. 287, 272 (1972)

6. AISENBERG, A.C., Long, J.C. and Wilkes, B.:
Chronic lymphocytic leukemia cells: Rosette formation and adherence to nylon fiber columns.
J. Nat. Cancer Inst. 52, 13 (1974)

7. ALTMAN, L.L., Kirchner, H.:
The production of a monocyte chemotactic factor by Agammaglobulinemic chicken spleen cells.
J. of Immunol., Vol. 109, Nr. 5, 1149 (1972)

8. ALTMAN, L.C., Snyderman, R., Oppenheim, J.J. and Mergenhagen, S.E.:
A human mononuclear leucocyte chemotactic factor: characterization, specificity and kinetics of production by homologous leucocytes.
J. Immunol. 110, 801 (1973)

9. BAIN, B., Löwenstein, L. and Mchean, L.D.:
The in vitro leycocyte reaction and initial studies in its application as a test fot hintocompatibility.
In: Histocompatibility testing, Washington National Academy of Sciences-National Research council 179, 1229 (1965)

10. BANKHURST, A.D., Warner, N.L.:
Surface immunglobulins on mouse lymphoid cells.
J. Immunol. 107, 368 (1971)

11. BARANDUN, S., Stampfli, Sprenger, G.A. und Riva, G.:
Die Klinik des Antikörpermangelsyndroms.
Helv. med. Acta 26, 163 (1959)

12. BARKER, B.E., Farnes, P.:
Histochemictery of blood treated with Pokeweed mitogen.
Nature 214, 787 (1967)

13. BARKER, B.E., Farnes, P.:
Mitogenic property of Wistaria floribunda seeds.
Nature 215, 659 (1967)

14. BERNARD, C., Ceraldes, A. and Bairon, M.:
Effect of phytohemagglutinin on blood - cultures of chronic lymphocytic leukaemias.
Lancet I, 667 (1964)

15. BLOOM, B.R., Bennet, B.:
Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed - Type hypersensitivity.
Science, 153, 80 (1966)

16. BOYSE, E.A., Old, L.J.:
Some aspects of normal and abnormal cell surface genetics.
Ann. Rev. Genet. 3, 269 (1969)

17. BOYUM, A.:
Isolation of leucocytes from the blood. Further-observation.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 21, 31 (1968)

18. BURNET, F.M.:
Immunological recognition of self.
Science 133, 307 (1961)

19. CEROTTINI, J.C., Nordin, A.A. and Brunner, K.T.:
Specific in vitro cytotoxicity of thymusderived lymphocytes sensitized to alloantigens.
Nature 228, 1308 (1970)

20. CHASE, M.W.:
Delayed type hypersensitivity and the immunology of Hodgkin's disease with parallel examination of sarcoidosis.
Cancer res. 26, 1097 (1960)

21. CHASE, M.W.:
The cellular transfer of cutaneons hypersensitivity to tuberculin.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 59, 134 (1945)

22. CLAMAN, H.N., Chaperon, E.A.:
Immunologi complementation between thymus and marrow cells - A model for the two cell theory of immunocompetence.
Transplant. Rev. 1, 92 (1970)

23. COOMLES, R.R.A., Gurner, B.W., Wilson, A.B., Holm, G. and Lindgren, B.:
Rosette-Formation between human lymphocytes and sheep red blood cells not involving immunglobulin receptors.
Int. Arch. Allergy 39, 658 (1970)

24. COOPER, M.D., Peterson, R.D. and Good, R.A.:
Delineation of the thymic and bursal lymphoid systems in the chicken.
Nature, Lond. 205, 143 (1965)

25. DAVID, J.R.:
Deleyed hypersensitivity in vitro:
Its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell - antigen interaction.
Proc. Natl. Acad. Sci (Wash), 56, 72 (1966)

26. DAVIS, A.J.S.:
The thymus and the cellular basis of immunity.
Transplant. Rev. 1, 43 (1969)

27. ELTVINGHAM, J.R., Kaplan, H.S.:
Impaired delayed hypersensitivity responses in 154 patients with Hodgkin's disease.
Nat. Cancer Inst. Monograph. 36, 107 (1973)

28. ELVES, M.W., Roath, S. and Israels, M.C.G..
The response of lymphocytes to antigen challenge in vitro.
Lancet I, 806 (1963)

29. ENGESET, A., Cooper, E.H., Brennhovd, I. and Hoeg, K.:
The thoracic duct in Hodgkin's disease.
II. Quantitative analysis of the cellular composition of the lymph.
Int. J. Cancer 8, 113 (1971)

30. FRÖLAND, S.S.:
Binding of sheep erythrocytes to human lymphocytes. A probable marker of T lymphocytes.
Scand. J. Immunol. 1, 269 (1972)

31. GLICK, B., Chang, T.S. and Jaap, R.G.:
The bursa of fabricius and antibody production.
Poultry Sci. 35, 224 (1956)

32. GOOD, R.A.:
Progress towards a cellular engineering.
J. Am. Med. Assoc. 214, 1389 (1970)

33. GOWANS, J.L.:
The recirculation of lymphocytes from blood to lymph.
Rat. J. Physiolog. London 146, 54 (1959)

34. GOWANS, J.L., McGregor, D.D.:
The immunological activities of lymphocytes.
Progr. Allergy 9, 1 (1965)

35. GREEN, I., Croso, P.F.:
A study of skin homografting in patients with lymphomen.
Blood 14, 235 (1959)

36. GREY, H.M., Rabellino, E. and Priofsky, B.:
Immunoglobulins on the surface of lymphocytes.
IV. Distribution in hypogammaglobulinemia, cellular immune deficiency and chronic lymphatic leukemia.
J. Clin. Invest. 50, 2368 (1971)

37. HAN, T., Sokal, J.E.:
Lymphocyte response to phytohemagglutinin in Hodgkin's disease.
Amer. J. Med. 48, 728 (1970)

38. HARRIS, H.:
Role of chemotaxis in inflammation.
Physiol. Rev. 34, 529 (1954)

39. HAVEMANN, K. und Schmidt, M.:
Lymphozytenkulturen bei Hodgkin'scher Erkrankung: Hinweise für zwei Lymphozytenpopulationen mit unterschiedlicher Reaktion auf Phytohämagglutinin (PHA).
Klin. Wschr. 46, 31 (1968)

40. HERSH, E.M., Irvin, W.S.:
Blastogenic response of lymphocytes from patients with untreated and treated lymphomas.
Lymphology 2, 150 (1969)

41. HERSH, E.M., Oppenheim, J.J.:
Impaired in vitro lymphocyte transformation in Hodgkin's disease.
New Engl. J. Med. 273, 1006 (1965)

42. HIRSCHHORN, K., Schreibman, R.R., Bach, F.H. and Siltzbach, L.E.:
In vitro studies of lymphocytes from patients with sarcoidosis and lymphoproliferative diseases.
Lancet II, 842 (1964)

43. HUMPHREY, J.H.:
Kurzes Lehrbuch der Immunologie aus dem englischen übersetzt.
Georg Thieme Verlag (1972)

44. JACKSON, S.M., Garrett, J.V., Path, F.C. and Craig, A.W.:
Lymphocyte transformation changes during the clinical course of Hodgkin's disease.
Cancer 25, 843 (1970)

45. JENNER, E.C.:
An inquiry into the causes and effects of varialae vaccine.
London, Low. (1797)

46. JONDAL, M., Holm, G. and Wigzell, H.:
Surface markers on human T and B lymphocytes. I. A large population of lymphocytes forming non immune rosettes with sheep red blood cells.
J. Exp. Med. 136, 207 (1972)

47. KATZ, D.H., Benacerraf, B.:
The regulatory influence of activated T cells ob B cell response to antigen.
Adv. Immunol. 15, 1 (1972)

48. KELLER, H.U., Sorkin, E.:
Chemotaxis of leucocytes.
Experimentia 24, 641 (1968)

49. KELLY, W.D., Lamb, D.L., Varco, R.L. and Good, R.A.:
An investigation of Hodgkin's disease with respect to the problem of homotransplantation.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 87, 187 (1960)

50. KINCADE, P.W., Lawton, A.R. and Cooper, M.D.:
Restriction of surface immunoglobulin determinants to lymphocytes of plasma cell line.
J. Immunol. 106, 1421 (1971)

51. KIRCHNER, H., Altman, L.C., Blaese, R.M. and Oppenheim, J.J.:
Studies of in vitro lymphocyte transformation and lymphokine produktion in agammaglobulinemic chickens.
Vierte Arbeitstagung über Leukozytenkulturen, Innsbruck, Austria (1973)

52. KLEIN, G.:
Immunological factors affecting tumor growth.
Brit. Med. J. 4, 418 (1970)

53. LAMB, D., Pilney, F., Kelly, W.D. and Good, R.A.:
A comparative study of the incidence of allergy in patients with carcinoma, leukenia, Hodgkin's disease and other lymphomas.
J. Immunol. 89, 555 (1962)

54. LANDSTEINER, K., Chase, M.W.:
Experiment on transfer of cutaneons sensitivity to simple compounds.
Proc. Soc. Exp. Biol. med. 49, 688 (1942)

55. LEVY, K., Kaplan, H.S.:
Impaired lymphocyte function in Hodgkin's disease.
New England J. Med. 290, 81 (1974)

56. MATCHETT, K.M., Huang, A.T. and Kremer, W.B.:
Impaired lymphocyte transformation in Hodgkin's disease. Clinical evidence for depletion of circulating T-lymphocytes.
J. Clin. Invest. 52, 1908 (1973)

57. MILLER, J.A.F.P.:
Effekt of neonatal thymectomy on the immunological responsiveness of the mouse.
Proc. R. Soc. B, 156 (1962)

58. MILLER, J.A.F.P.:
Interaction between T-cells and B-cells in humoral antibody responses.
Adv. Exp. Med. Biol. 12 (Ed. K. Lindahl-Kiessling, G. Alm and M.G. Hanna), 93 (1971)

59. MILLER, J.A.F.P., Osoba, D.:
Current concepts of the immunological function of the thymus.
Physiol. Rev. 47, 437 (1967)

60. NASPITZ, C.K., Richter, M.:
The action of phytohemagglutinin in vivo and in vitro, a review.
Prog. Allergy 12, 1 (1968)

61. NOSSAL, G.J.V., Warner, N.L., Lewis, H. and Spent, J.:
Quantitative features of a sandwich radio-immunolabeling technique for lymphocyte surface receptors.
J. E. M. 135, 405 (1972)

62. NOWELL, P.C.:
Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leucocytes.
Cancer Res. 20, 462 (1960)

63. OPPENHEIM, J.J., Blaese, R.M., Horton, J.E., Thor, D.E. and Granger, G.A.:
Production of macrophage migration inhibitory factor and lymphotoxin by leucocytes from normal and Wiskott-Aldrich Syndrome patients.
Cell. Immunol. 8, 62 (1973)

64. OPPENHEIM, J.J., Whang, J. and Frei, E.:
Immunologic and cytogentic studies of chronic lymphocytic leukemia cells.
Blood 26, 121 (1965)

65. OWEN, J.J.T.:
The orignis and development of the lymphocyte populations.
"Ontogeny of Aquired Immunity". Ciba Foundation Symposium (1972)

66. PASTEUR, L.:
Comptes rendus des travaux du congrés international des direkteurs des stations agranomique.
Session de Versailles, PP. 151 (1881)

67. PEARMAIN, G.E., Lycette, R.R. and Fitzgerald, P.H.:
Tuberculin-induced mitosis in peripheral blood leucocytes.
Lancet I, 637 (1963)

68. PERNIS, B., Forni, L. and Amante, L.:
Immunglobulin spots on the surface of rabbit lymphocytes.
J. Exp. Med. 132, 1001 (1970)

69. PERNIS, B., Ferrarini , M. and Forni, L.:
Immunglobulins on lymphocyte membrane.
In: Progress in Immunology (Edt. B. Amos)
Academic Press N.Y. 95 (1971)

70. PICK, E., Turk, J.L.:
The biological activities of soluble lymphocyte product.
Clin. exp. Immunol. 10, 1 (1972)

71. POLLIACK, A., Lampen, N., Clarkson, B.D., De Harven, E., Bentwich, Z., Siegal, F.P. and Kunkel, H.G.:
Identification of human B and T lymphocytes by scanning electron microscopy.
J. of Exp. Med. 138, 607 (1973)

72. POWELL, A.E., Leon, M.A.:
Reversible interaction of human lymphocytes with the mitogen Concanavalin A.
Exp. Cell. Res. 62, 315 (1970)

73. RABELLINO, E., Colon, S., Grey, H.M. and Unanne, E.R.:
Immunoglobulin on the surface of lymphocytes.
J. Exp. Med. 133, 156 (1971)

74. RAFF, M.C.:
Surface antigenic markers for distinguishing T and B lymphocytes in mice.
Transplant. Rev. 6, 52 (1971)

75. RAFF, M.C.:
Theta iso-antigen as a marker of thymus derived lymphocytes in mice.
Natur 224, 378 (1969)

76. ROBBINS, J.H.:
Human peripheral blood in tissue culture and the action of phytohemagglutinin.
Experimentia, Basel 20, 164 (1964)

77. ROCKLIN, R.F., Sheffer, A. and David, J.R.:
Sarcoidosis: a clinical and immunologic study.
In: Proc. sixth Leuc. Culture Conf. (M.R. Schwarz), Academic Press 743 (1972)

78. ROSENBERG, S.A.:
Report of the committee on the staging of Hodgkin's disease.
Cancer Res. 26, 1310 (1966)

79. RUBIN, A.D.:
In vitro evaluation of lymphocyte proliferation in lymphoproliferative disorders.
Proc. of the fifth leucocyte culture conference (Ed. J.E. Harris). Academic Press London P. 239 (1970)

80. RÜHL, H., Scholle, H. und Kirchner, H.:
Stimulation peripherer menschlicher Lymphozyten in vitro durch Zn^{2+} bei Patienten mit lymphogranulomatose und chronischer lymphatischer Leukämie.
Acta haemat. 46, 326 (1971)

81. RÜHL, H., Vogt, W., Bochert, G., Schmidt, S., Moelle, R. and Schaoua, H.:
Effect of L-asparaginase and hydrocortisone on human Lymphocyte transformation and production of a mononuclear Leucocyte chemotactic factor in vitro.
Immunology 26, 989 (1974)

82. SCHEURLEN, P.G., Pappas, A. und Ludwig, T.:
Stimulation der Blutlymphozyten durch Phytohämagglutinin bei chronischer Lymphadenose, Lymphosarkomatose und Lymphogranulomatose.
Klin. Wschr. 46, 483 (1968)

83. SCHEURLEN, P.G., Schneider, W. and Pappas, A.:
Inhibition of transformation of normal lymphocytes by plasma factor from patients with Hodgkin's disease and cancer.
Lancet, II, 1265 (1971)

84. STEINER, P.E.:
Etiology of Hodgkin's disease; skin reactions to avian and human tuberculin proteins in Hodgkin's disease.
Arch. Int. Med. 54, 11 (1934)

85. STOBO, J.D., Paul, W.E.:
Funcional heterogeneity of murine Lymphoid cells III Differential responsiveness of T-cells to phyto-hemagglutinin and concanavalin A as a probe for T-cell subsets.
J. Immunol. 110, 362 (1973)

86. TANAKA, Y., Epstein, L. B., Brecher, G. and Stohlman, F. Jr.:
Transformation of lymphocytes in cultures of human peripheral blood.
Blood 22, 614 (1963)

87. THIELE, H.G.:
Untersuchungen zur Frage der Immunglobulinsynthese durch mit PHA in vitro stimulierte menschliche Lymphozyten.
Zeitschrift Immunitätsforschung 135, 331 (1968)

88. THOMAS, J.W., Boldt, W., Horrocks, G. and Low, B.:
Lymphocyte transformation by phyothaemagglutinin. I. In Hodgkin's disease.
Canad. Ass. J. 97, 832 (1967)

89. UHR, J.W. and Vitteta, E.S.:
Synthesis, biochemistery and dynamics of cell surface immunoglobulin on lymphocytes.
Fed. Proc. 32, 35 (1973)

90. VITTETA, E.S., Bianco, C., Nussenzweig, V. and Uhr, J.W.:
Cell surface immunoglobulin.
IV. Distribution among thymocytes, bone marrow cells and their derived populations.
J. E. Med. 163, 81 (1972)

91. WILSON, J.D., Nossal, G.J.K.:
Identification of human T and B lymphocytes in normal peripheral blood and in chronic lymphocytic leukaemia.
Lancet, 9, 788 (1971)

92. YOFFEY, J.M., Winter, G.C.B., Osmond, D.G. and Meek, E.S.:
Morphological studies in the culture of human leucocytes with phytohaemagglutinin.
Brit. J. Haemat. II, 488 (1965)

Ich danke Herrn Professor Dr. med. H. Brücher, Herrn Dr. med. H. Rühl und Herrn Dr. med. W. Vogt für die Überlassung des Themas und für die wertvolle Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit.

Für das ausgezeichnete technische Assistieren bin ich Frau Gudrun Bochert zu Dank verpflichtet.

Lebenslauf

Am 1. 12. 1947 wurde ich als Sohn des Kaufmanns Subhi Schaoua und dessen Ehefrau Wasfie Schaoua, geborene Saban, in Damaskus geboren. Mein Vater verstarb am 21. 7. 1953.

Von 1954 bis 1960 besuchte ich die Grundschule.
Am Omaya-Gymnasium bestand ich im September 1967 die Reifeprüfung.

Im Januar 1968 bin ich nach Berlin gekommen, um Medizin zu studieren. Hier habe ich zuerst das Goethe-Institut besucht sowie das Studien-Kolleg für ausländische Studenten. Im Sommersemester 1970 wurde ich zum Studium der Medizin zugelassen. Die naturwissenschaftliche Vorprüfung legte ich im Frühjahr 1971 ab. Am 8. 9. 1972 bestand ich das Physikum.
Während des weiteren klinischen Studiums in Berlin befaßte ich mich mit experimentellen Fragen der zellgebundenen Immunität in der Hämatologischen Abteilung des Klinikums Steglitz.

Am 9. 2. 1976 bestand ich das ärztliche Staatsexamen.